

cited in the European Search
Report of EP 08 15 2603 0
Your Ref.: TG 163 EP



Our Ref.: H2216815

(19) BUNDESREPUBLIK (20) **Offenlegungsschrift**
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(51) Int. Cl. 6:
A 61 K 38/20

(10) **DE 198 23 351 A 1**

(21) Aktenzeichen: 198 23 351.5
(22) Anmelddatum: 13. 5. 98
(23) Offenlegungstag: 10. 12. 98

DE 198 23 351 A 1

(66) Innere Priorität:
197 21 867. 9 16. 05. 97

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

(71) Anmelder:
Krause, Hans, Dr., 13086 Berlin, DE; Pohl, Thomas,
Dr., 12055 Berlin, DE; Bulfone-Paus, Silvia, Dr.Dr.,
12161 Berlin, DE; Kunzendorf, Ulrich, Prof.Dr.,
91054 Erlangen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- (54) Mittel zur Verhinderung der Zellapoptose bei Krankheiten
(55) Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Verhinderung der Zellapoptose, das auf der Entdeckung beruht, daß die Aktivierung des Interleukin-15-Rezeptors Zellen vor der Apoptose schützt und das dadurch gekennzeichnet ist, daß es Interleukin-15, seine Derivate, Interleukin-15 Fusionsproteine oder an den Interleukin-15-Rezeptor gekoppelte Substanzen enthält.

DE 198 23 351 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Verhinderung der Zellapoptose. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein natürlicher Vorgang des Organismus, der bei der Entwicklung eines Organismus auftritt, aber auch bei einer Reihe von pathologischen Zuständen. So sind verschiedene virale Infektionen mit Apoptose assoziiert. Unter anderem wird das akute Leberversagen nach Infektion mit Hepatitisviren durch Leberzellapoptose verursacht. Ein entscheidender Pathomechanismus der HIV-Erkrankung liegt in der Potenz des Virus, Apoptose zu induzieren. Darüber hinaus gehen neurodegenerative Erkrankungen mit einer pathologisch gesteigerten Apoptose einher. Tumoren, wie z. B. Melanome werden deshalb nicht vom Körper effektiv bekämpft, weil die für die Bekämpfung zuständigen Leukozyten durch Tumorzellen in die Apoptose getrieben werden. Eine Reihe von Cytostatika, wie Adreamycin und Etoposid sind deswegen so knochenmarktoxisch, weil blutbildende Stammzellen in die Apoptose getrieben werden. Insofern ist es von großem medizinischen Interesse, eine Substanz in der Hand zu haben, die gezielt eingesetzt werden kann, um Apoptose zu hemmen.

Es sind bereits einige Apoptosehemmner bekannt. Hierbei handelt es sich um virale Genprodukte und pharmakologisch wirksame Substanzen, die jedoch nur in ganz speziellen Situationen Apoptose hemmen können und deshalb nicht klinisch realisiert worden sind (vgl. Science 267, S. 1457; 1995).

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, eine Substanz zur Verfügung zu stellen, die effektiv zur Hemmung der Apoptose bei Krankheiten eingesetzt werden kann.

Der Erfindung liegt die überraschende Entdeckung zugrunde, daß die Aktivierung des Interleukin-15-Rezeptors Zellen vor der Apoptose schützt.

Erfindungsgemäß erfolgt die Aktivierung des Interleukin-15-Rezeptors vorzugsweise durch Interleukin 15 oder andere Substanzen, wie z. B. Derivate des IL-15 oder Antikörper gegen den Interleukin-15-Rezeptor.

Interleukin-15 ist überraschenderweise in der Lage, unterschiedliche Zelltypen vor dem programmierten Zelltod zu bewahren; es ist ein Zytokin, das natürlicherweise von verschiedenen Zellen des Körpers produziert wird und erstmalig von einer amerikanischen Gruppe 1994 beschrieben wurde (Science 264, S. 965; 1994). Unabhängig von seinen bekannten Funktionen in der Unterstützung der Zellproliferation (Zellvermehrung) wurde erfindungsgemäß nachgewiesen, daß Interleukin-15 eine Reihe von Zellen mesenchymalen, epidermalen und endodermalen Ursprungs vor dem programmierten Zelltod bewahrt.

Ausgehend von diesem Befund wurde das erfindungsgemäße Mittel entwickelt, das durch einen Gehalt an Interleukin-15, seine Derivate oder Interleukin-15 Fusionsproteine gekennzeichnet ist.

Als Derivate von IL-15 kommen alle Proteine in Betracht, die an den IL-15-Rezeptor binden.

Als IL-15 Fusionsproteine werden bevorzugt alle Substanzen eingesetzt, bei denen IL-15 oder seine Derivate an ein Protein fusioniert ist und der antiapoptotische Effekt durch Bindung an den IL-15-Rezeptor vermittelt wird. Besonders bevorzugt ist das Fusionsprotein IL15-IgG2b.

Wird IL-15 an Immunglobuline gekoppelt, so wird die Plasma-Halbwertzeit so verlängert, daß es im Körper praktikabel eingesetzt werden kann. Im Mausmodell wurde gezeigt, daß dieses Interleukin-15 Fusionsprotein die Fas-vermittelte, üblicherweise zu 100% tödliche Leberzellapoptose

in allen Fällen komplett hemmt. Darüber hinaus wurde im Mausmodell auch die nichttödliche Apoptose von aktivierten T-Zellen und B-Zellen durch dieses Fusionsprotein komplett gehemmt.

5 Diese Eigenschaften machen IL-15, seine Derivate und IL-15 Fusionsproteine hervorragend für eine Verwendung zur Verhinderung der Zellapoptose bei Krankheiten geeignet. Das in Frage kommende Krankheitsspektrum ist sehr groß. So fallen unter anderem vorzugsweise darunter: Entzündungen der Leber durch Viren verursacht, HIV-Infektionen, strahleninduzierte Schäden, neurodegenerative Erkrankungen sowie toxische Schäden, Effektivierung der Tumorthерапie und eine Reihe weiterer Erkrankungen.

Darüber hinaus werden erfindungsgemäß pharmazeutische Wirkstoffe eingesetzt, die durch Bindung an den IL-Rezeptor antiapoptotische Wirkungen entfalten.

15 Die erfindungsgemäßen Mittel werden vorzugsweise mit an sich üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Träger- und Zusatzstoffen hergestellt und appliziert, besonders bevorzugt als isotonische Lösung.

20 Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

25 1.) IL-15 hemmt die Apoptose in aktivierten B-Zellen, die durch anti-IgM Antikörper, anti-Fas Antikörper oder anti-IgM Antikörper und Dexamethason induziert wird

30 Durch Behandlung mit anti-Fas/APO 1(1), anti-IgM (2) oder anti-IgM plus Dexamethason (2) konnte bei aktivierten, humanen B-Zellen Apoptose induziert werden. Nach Koinkubation mit 10 ng/ml rekombinantern, humanem IL-15 wurden die Zellen der Apoptoseinduktion gegenüber resistent, und zwar gegenüber allen drei Stimuli (Fig. 1). IL-15 unterdrückt offensichtlich experimentell induzierte DNA Fragmentierung (Fig. 1A) und verhindert die Bildung von Kernen mit hypodiploider DNA (Fig. 1B), ein Indikator der Apoptose, welches durchflußzytometrisch mittels Propidiumiodidfärbung (PI) sichtbar gemacht werden kann (3).

35 Bemerkenswerterweise unterdrückte die IL-15 Behandlung nicht nur die Apoptose, sondern hielt B-Zellen auch in der S-Phase des Zellzyklus; dies konnte durch die IL-15 vermittelte Wiederherstellung des normalen, breiten, einschlürtigen, diploiden DNA Peaks erkannt werden, der den tripel PI Peaks, wie aus Fig. 1B (4) hervorgeht, gegenüberstellt (Zellen in der Apoptose, in G1 oder G2/M Phase darstellend).

40 2.) IL-15 hemmt die Apoptose in aktivierten T-Zellen, die durch anti-Fas Antikörper, anti-CD3 Antikörper oder Dexamethason induziert wird

Vergleichbare anti-apoptotische in vitro Effekte von IL-15 konnten gefunden werden, wenn ConA-aktivierte, humane T-Lymphoblasten, die wie bereits beschrieben hergestellt wurden (5), durch Behandlung mit anti-Fas/APO 1(1), mit anti-CD3 Antikörpern (6) oder durch Dexamethason (7) in die Apoptose getrieben wurden: in allen Fällen wurde die Apoptose signifikant durch Koinkubation mit 10 ng/ml IL-15 gehemmt, gezeigt durch DNA-laddering (Fig. 2A) und PI Durchflußzytometrie (Fig. 2B).

45 Wie bereits beschrieben (8), war die durch anti-Fas Antikörper induzierte T-Zell Apoptose unabhängig von der Proteinsynthesē. Demgegenüber war jedoch die IL-15 vermittelte Unterdrückung der anti-Fas Antikörper induzierten T-Zell Apoptose streng Proteinsyntheseabhängig, so beeinflußte IL-15 die bereits induzierte Apoptose nicht mehr in

Gegenwart von Actinomycin D als Inhibitor der RNA und Proteinfbiosynthese (Fig. 2C). Diese Ergebnisse der DNA-laddering Experimente stehen den Daten der Dexarnethason induzierten T Zell Apoptose gegenüber, die ausschließlich in Abwesenheit von Actinomycin D induziert werden konnte (Fig. 2C). Demzufolge moduliert IL-15 in breitem Rahmen apoptotische Mechanismen in T und B Zellen (1,9). Vorläufige Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, daß IL-15 auch die TNF- α induzierte Apoptose in transformierten, murinen L929 Fibroblasten hemmt, und daß es die Adriamycin- oder Etoposide-, nicht jedoch die γ -strahlung induzierte Apoptose in murinen T Blasen unterdrücken kann (Bulfone-Paus et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

3.) IL-15 hemmt die Apoptose in einem durch anti-Fas Antikörper induzierten Multikomponentensystem des kurzfristig lethalen Leberversagens

Um zu überprüfen, ob diese in vitro Effekte auch in vivo auftreten und um herauszufinden, ob die anti-apoptotischen Effekte von IL-15 sich auch über das lymphatische System hinaus erstrecken, haben wir die Modulation der anti-Fas Antikörper induzierten, multi-Systern Apoptose und des kurzfristig lethalen Leberversagens in Mäusen (10) nach systemischer Gabe von IL-15 untersucht. Anstatt IL-15 Zytokin mit seiner kurzen biologischen Halbwertszeit zu verwenden, haben wir zu diesem Zweck ein neues, chimerisches Fusionsprotein aus huinanem IL-15 und murinem IgG2b hergestellt (IL-15-IgG2b), das den Vorteil einer erheblich verlängerten biologischen Halbwertszeit bietet. Zur Herstellung des IL-15-IgG2b Fusionsproteins wurden grundsätzlich die gleichen Methoden zur Konstruktion und Produktion von Zytokin-Immunglobulin Fusionsproteinen verwendet, die bereits bei der Erzeugung IL-2-IgG chimerärer Proteine benutzt wurden (11). Vergleichsweise wurden Fusionproteine aus murinem IL-2 und murinem Immunglobulin G2b (IL-2-IgG2b) (11) in dem gleichen murinen Modell der durch anti-murines Fas induzierten, massiven Apoptose in zwei verschiedenen Mausstämmen getestet (BALB/c and C57BL/6). Die intraperitoneale Injektion von 100 μ g von anti-murines Fas monoklonalem Antikörper (Jo2) verursachte innerhalb weniger Stunden fulminantes Leberversagen und Tod von BALB/c Mäusen, bedingt durch massive, Fas-vermittelte Apoptose der Hepatozyten, wie bereits beschrieben (10).

In beeindruckender Weise verhinderte die simultane, intraperitoneale Injektion von 75 μ g IL-15-IgG2b Fusionsprotein vollständig die anti-Fas-induzierte Apoptose der Hepatozyten und das Leberversagen, und führte zu einer 100%igen Überlebensrate der mit Fusionsprotein behandelten Mäuse, im Gegensatz zu 0% Überlebensrate der ausschließlich anti-Fas behandelten Tiere (Fig. 3A). Gleiche Ergebnisse wurden mit C57BL/5 Mäusen erhalten (Daten nicht gezeigt).

Dieser Effekt war abhängig von der applizierten Dosis, d. h. mit niedrigeren Konzentrationen an IL-15 Fusionsprotein konnte der anti-Fas induzierte Tod zwar nicht verhindert, sein Eintreten jedoch signifikant verzögert werden: in BALB/c Mäuse (n=5 Mäuse pro Gruppe) wurde 100 μ g anti-murines Fas Antikörper (Jo2) und unterschiedliche Mengen an IL-15-IgG2b Fusionsprotein injiziert: 100 μ g, 75 μ g, 50 μ g, 25 μ g, 0 μ g.

Bei Mäusen, die mit IL-15-IgG2b Fusionsprotein in Gegenwart von neutralisierendem anti-IL-15 Antikörper behandelt wurden, konnte kein protektiver Effekt festgestellt werden; so ist anzunehmen, daß die anti-apoptotischen Eigenschaften des Fusionsproteins durch seinen IL-15 Teil

vermittelt werden. So verlängerte in der Tat die Injektion von nativem IL-15 (1 μ g) in Verbindung mit anti-Fas Antikörper die Überlebensdauer der Testmäuse (n=5) im Vergleich zu Kontrollen, die nur anti-Fas Antikörper erhalten hatten (n=5), jedoch lediglich für einen Zeitraum von 6-12 Stunden (Daten nicht gezeigt).

Demgegenüber ergab sich nach Injektion von IL-2-IgG2b Fusionsprotein keinerlei protektiver Effekt (Fig. 3A-D). Zwar ist es nicht überraschend, daß das IL-2 Fusionsprotein die massive Apoptose der Hepatozyten nicht verhindern konnte, da Hepatozyten keine IL-2 Rezeptoren exprimieren, bemerkenswert ist jedoch, daß die anti-Fas induzierte Apoptose in Thymozyten und Splenozyten mit ihrer reichen Expression an IL-2 Rezeptor (12) nicht durch IL-2 Fusionsprotein beeinflußt wird.

Diese Ergebnisse unterstreichen einen weiteren funktionellen Unterschied zwischen IL-2 und IL-15 und zwar bezogen auf ihre verschiedenen Effekte auf die Apoptose in vivo, und verdeutlichen eine verwirrende Vielfalt der Mechanismen zur Apoptosemodulation durch IL-2 in vivo (13, 14). Da beide Fusionsproteine denselben IgG2b Teil enthalten, legen diese Ergebnisse nahe, daß dieser keinen wesentlichen Einfluß auf die Modulation der Apoptose besitzt. Leber, Milz und Thymus von Versuchs- und Kontrollmäusen wurden zum Zeitpunkt des Todes entnommen, bzw. spätestens sechs Stunden nach den anti-Fas Injektionen im Falle der überlebenden Tiere. Die aus Leber, Milz und Thymus extrahierte DNA wurde durch Agarosegelektrophorese auf mögliche Endonukleaseaktivität, sowie Gefrierschnitte der Gewebe mit der in situ - end-labeling TUNEL Technik zur Darstellung der Apoptose untersucht. In Fig. 3B ist repräsentativ gezeigt, wie die DNA aus allen Tieren, die lediglich mit anti-Fas Antikörper allein oder zusätzlich mit IL-2-IgG2b Fusionsprotein behandelt worden waren, fragmentiert war. Demgegenüber konnte nach gleichzeitiger Gabe von IL-15-IgG2b Fusionsprotein keinerlei DNA Fragmentierung gefunden werden, die eine massive Apoptose in Leber, Milz oder Thymus anzeigen (Fig. 3B). Eine Blockierung der IL-15-IgG2b Aktivität durch gleichzeitige in vivo Gabe von neutralisierendem anti-IL-15 Antikörper stellte die anti-Fas induzierte DNA Fragmentierung wieder her (Fig. 3B). Diese Ergebnisse konnten durch morphologische Daten (TUNEL, Hoechst 33342 Färbung) bestätigt werden, die zeigen, daß Schnitte von Milz (Fig. 3C) und Leber (Fig. 3D) ebensowenige TUNEL-positive Zellen aufweisen wie die Kontrollschnitte.

Dies steht im Gegensatz zum dramatischen Ausmaß der Apoptose von Splenozyten und Hepatozyten, in Gewebschnitten aus Milz (Fig. 3C) und Leber (Fig. 3D) von Mäusen, die nur mit anti-Fas allein behandelt worden waren. Die Hemmung der anti-Fas induzierten Apoptose in Leberschnitten von IL-15-IgG2b behandelten Mäusen war mit einer Bcl-2 Immunreaktivität assoziiert, vergleichbar der in Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt).

Demzufolge korrelieren die Effekte von IL-15 auf die induzierte Apoptose in humanen T und B Zellen in vitro (Fig. 1, 2) mit der Unterdrückung des experimentell induzierten programmierten Zelltodes im murinen Thymus und der Milz durch ein IL-15 Fusionsprotein in vivo (Fig. 3). Daraufhin wurde die lethale Apoptose von epithelialen Zellen (Hepatozyten) in vivo vollständig durch den IL-15 Teil dieses Fusionsproteins gehemmt, dieses zeigt, daß die anti-apoptotischen Eigenschaften von IL-15 über das lymphatische System hinausgehen.

Die Signalübertragungswege, auf denen IL-15 in die Kontrollmaschinerie der Apoptose eingreift, z. B. in Lymphozyten und Hepatozyten, müssen erst noch geklärt werden. Immerhin zeigen unsere Ergebnisse, daß IL-15 den in-

duzierenden Effekt zum programmierten Zelltod einer Reihe wichtiger, physiologischer Stimuli hemmt, und daß zumindest zur Unterdrückung der Fas-vermittelten Apoptose in humanen Lymphozyten de novo Proteinsynthese erforderlich ist. In Verbindung mit den verschiedenen Mechanismen der Lymphozytenapoptose, die von IL-15 in vitro unterbunden werden, legt dies die Vermutung nahe, daß IL-15 seinen anti-apoptotischen Effekt durch Modulation allgemeiner Schlüsselemente der Apoptosekontrolle ausübt, die durch unterschiedlichste Zellpopulationen und die Apoptose regulierende Systeme verwendet werden; als Beispiel seien die Mitglieder der Bcl-2 und/oder der ICE-Familien der Apoptosekontrollproteine genannt (1, 9).

Zusammengefaßt belegt die vorliegende Studie IL-15 als einen potentiellen, allgemeinen Inhibitor der Apoptose in vivo und in vitro. Mit hoher Wahrscheinlichkeit besitzen IL-15 und IL-15 Fusionsproteine ein sehr vielversprechendes therapeutisches Potential, nicht nur in der Hemmung der Lymphozytenapoptose, beispielsweise bei einer HIV Infektion, sondern vielmehr auch zur Behandlung eines Organversagens oder Atrophie aufgrund überhöhter Apoptose, z. B. bei kurzfristig toxischen, lethalen Leberversagen und bei neurodegenerativen Prozessen (15).

REFERENCES

1. Nagata, S., Golstein, P. The FAS death factor. *Science* 267, 1449-1456 (1995).
2. Scott, D.W., Grdina, T. & Shi, Y. T cells commit suicide, but B cells are murdered! *J. Immunol.* 156, 2352-2356 (1996).
3. Nicoletti, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139, 271-279 (1991).
4. Darzynkiewicz, Z. in *Cell cycle analysis by flow cytometry*. *Cell Biology A Laboratory Handbook*. (ed. Julio E. Celis) 261-271. Academic Press Inc., San Diego (1994).
5. Bulfone-Paus, S., Duerkop, H., Paus, R., Krause, H., Pohl, T. & Onu, A. Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15. *Cytokine*, in press (1997).
6. Wesselborg, S., Janssen, O. & Kabelitz, D. Induction of activation driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 150, 4338-4345 (1993).
7. Zacharchuk, C.M. et al. Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroidinduced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 145, 4037-4045 (1990).
8. Los, M. et al. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375, 81-83 (1995).
9. Ehl, S., Hoffmann-Rohrer, U., Nagata, S., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. Different susceptibility of cytotoxic T cells to CD95 (Fas/Apo-1) ligand-mediated cell death after activation in vitro versus in vivo. *J. Immunol.* 156, 2357-2360 (1996).
10. Agasawara, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809 (1993).
11. Kunzendorf, U. et al. Suppression of cell-mediated an humoral immune responses by an interleukin-2-immunoglobulin fusion protein in mice. *J. Clin. Invest.* 97, 1204-1210 (1996).
12. Cohen, J.J. & Duke, R. C. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132, 38-42

(1984).

13. Lenardo, M.J. Interleukin-2 programs mouse αβ T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861 (1991).
14. Lacroix, V. et al. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nature Med* 2, 80-86 (1996).
15. Ashkenazi, A. & Shamov, S.M. Immunoadhesins as research tools and therapeutic agents. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 195-200 (1997).

Fig. 1 IL-15 hemmt die Apoptose in aktivierten B Zellen.

(A) Agarosegel Electrophorese von DNA, extrahiert aus humanen B Zellen, die für 48 Stunden mit 10 ng/ml PMA stimuliert wurden und nachfolgend 12 Stunden mit Medium (Spur 1) oder 10 ng/ml rekombinantern humanen IL-15 (Spur 2) oder 250 ng/ml anti-Fas (anti-APO-1/FAS) (Spur 3) oder anti-Fas und IL-15 (Spur 4) oder 0,1 µg/ml anti-humanen IgM (Spur 5) oder anti-humanen IgM und IL-15 (Spur 6) oder anti-humanen IgM und einem 1 pM Dexametason (Dex) (Spur 7) oder einem antihumanen IgM in Kombination mit Dexametason und IL-15 (Spur 8) behandelt wurden. (B) DNA fluoreszenz-cytometrische Profile von PI gefärbten, aktivierten B Zellen die, die gleichen experimentellen Bedingungen wie unter A beschrieben, durchlaufen haben. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten erhalten, die B Zell Präparation erfolgten von verschiedenen Tönsillen.

Fig. 2 IL-15 schützt aktivierte T Zellen vor der Apoptose.

(A) 10 µg/ml ConA-aktivierte humane T-Blasten werden für 12 Stunden in Anwesenheit von Medium alleine (Spur 1), oder 10 µg/ml rekombinantern humanen IL-15 (Spur 2) oder anti-Fas Antikörpern (Spur 3) oder anti-Fas plus IL-15 (Spur 4) oder 10 µg/ml anti-CD3 (Spur 5) oder anti-CD3 plus IL-15 (Spur 6) oder 0,1 µM Dex (Spur 7) oder Dex plus IL-15 (Spur 8) kultiviert. Die Fragmentation der DNA wurde mittels Elektrophorese auf einem 2% Agarosegel analysiert. (B) DNA FACS-Analyse von PI gefärbten ConA-aktivierten humanen T-Lymphoblasten nach 12 Stunden Inkubation unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie oben beschrieben. (C) Das DNA Degradationsassay erfolgt zum Nachweis der Apoptose in aktivierten T-Zellen, die für 12 Stunden in Medium (Spur 1, 7) IL-15 (Spur 2, 8) anti-Fas (Spur 3, 9) anti-Fas und IL-15 (Spur 4, 10) Dex (Spur 5, 11) oder Dex und IL-15 (Spur 6, 12) in Abwesenheit (Spur 1 bis 6) oder in Anwesenheit (Spur 7 bis 12) von 50 ng/ml Actinomycin D (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.) behandelt wurden. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängig durchgeföhrten Experimenten pro Gruppe, wobei humane T-Zellen von drei verschiedenen Spendern benutzt wurden.

Fig. 3 IL-15 Fusionsproteine schützen Zellen vor anti-Fas

Antikörper vermittelten Apoptose in vivo. (A) Bei BALB/c Mäusen wurden mit 100 µg anti-Fas Antikörper (Jo2) allein, oder in Kombination mit 100 oder 50 µg IL-15-IgG2b Fusionsprotein oder in Kombination mit 100 µg IL-2-IgG2b und 100 µg mit neutralisierendem anti-IL-15 Antikörper (MILL) oder mit 50 µg IL-2-IgG2b Fusionsprotein behandelt. Die nichtbehandelten Mäuse (Ergebnisse nicht gezeigt) dienten als zusätzliche Kontrollen, deren Überlebenszeit betrug 100% in 24 Stunden. Pro Test und Kontrollgruppe wurden in allen Experimenten 5 Mäuse analysiert, die Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt. Die gezeigten Daten sind Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. (B) DNA Degradationsanalyse von suspendierten Zellen der Milz, Leber und des Thymus von Kontrollmäusen (Spur b bis d) oder anti-Fas (Spur e bis g) oder anti-Fas plus 100 µg IL-15-IgG2b (Spur h bis j) oder anti-Fas plus 50 µg IL-15-

IgG2b (Spur k bis m) oder anti-Fas plus 100 µg IL-15-IgG2b und 100 µg anti-IL-15 Antikörper (Spur n bis p) und anti-Fas plus IL-2-IgG2b (Spur q bis s) behandelten Mäusen. Spur a zeigt eine Standard 1 kb Leiter. In-situ-end-labelling – (TUNEL) (grüne Kerne entsprechen apoptotischen Zellen) und Hoechst 33342 (blaue Kerne)– Färbung von Leber- und Milz-Kryoschnitten der Mäuse, die entsprechend der Beschreibung unter 3A behandelt wurden.

Fig. 4 Die Hemmung der anti-Fas induzierten Apoptose in vivo durch das IL-15-IgG2b Fusionsproteins ist abhängig von dem IL-15 Teil. Mäuse wurden behandelt mit 100 µg anti-Fas Antikörpern (Jo2) entweder in Kombination mit 100 µg oder 50 µg IL-15-IgG2b Fusionsprotein oder 100 µg IL-15-IgG2b und 100 µg anti-IL-15 Antikörper oder 50 µg IL-2-IgG2b Fusionsprotein. Die histometrische Quantifikation der apoptotischen Zellen (Fig. 3C und 3D) wurde bei einer 400-fachen Vergrößerung durchgeführt, in dem 10 Felder nach TUNEL-positiven Zellen ausgezählt wurden. A repräsentiert Leberschnitte, B Milzschnitte.

5

15

20

Patentansprüche

1. Mittel zur Verhinderung der Zellapoptose bei Krankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß es Interleukin-15, seine Derivate, Interleukin-15-Fusionsproteine oder an den Interleukin-15-Rezeptor gekoppelte Substanzen enthält.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es das Fusionsprotein IL15-IgG2b enthält.
3. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1 oder 2 zur Verhinderung der Zellapoptose.
4. Verwendung nach Anspruch 3 bei durch Viren verursachten Entzündungen der Leber.
5. Verwendung nach Anspruch 3 bei HIV-Infektionen.
6. Verwendung nach Anspruch 3 bei strahlen-induzierten Schäden.
7. Verwendung nach Anspruch 3 bei neurodegenerativen Erkrankungen.
8. Verwendung nach Anspruch 3 bei toxischen Schäden.

40

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

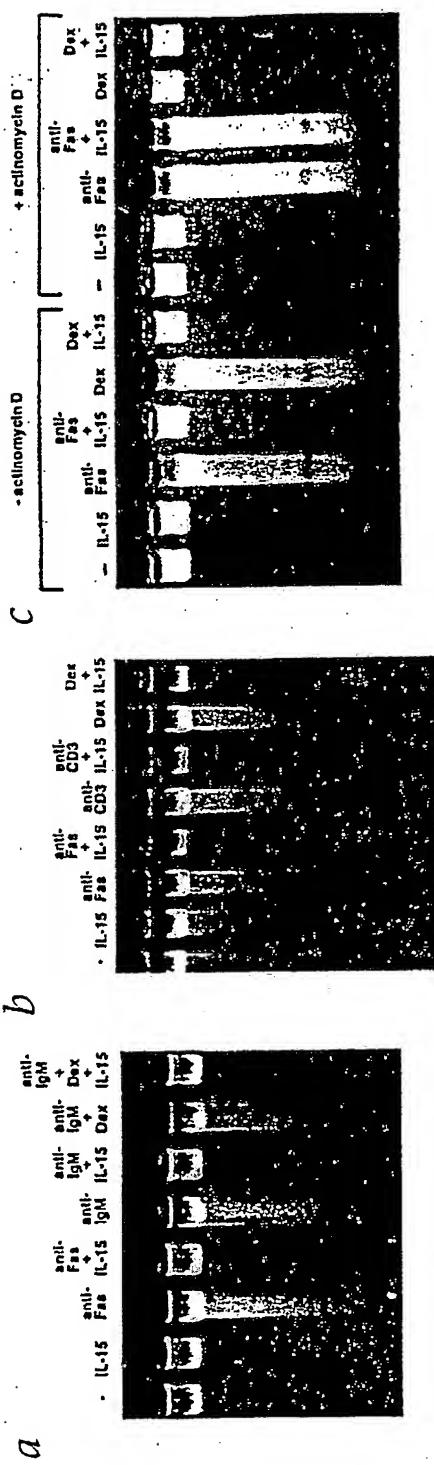


Fig. 1

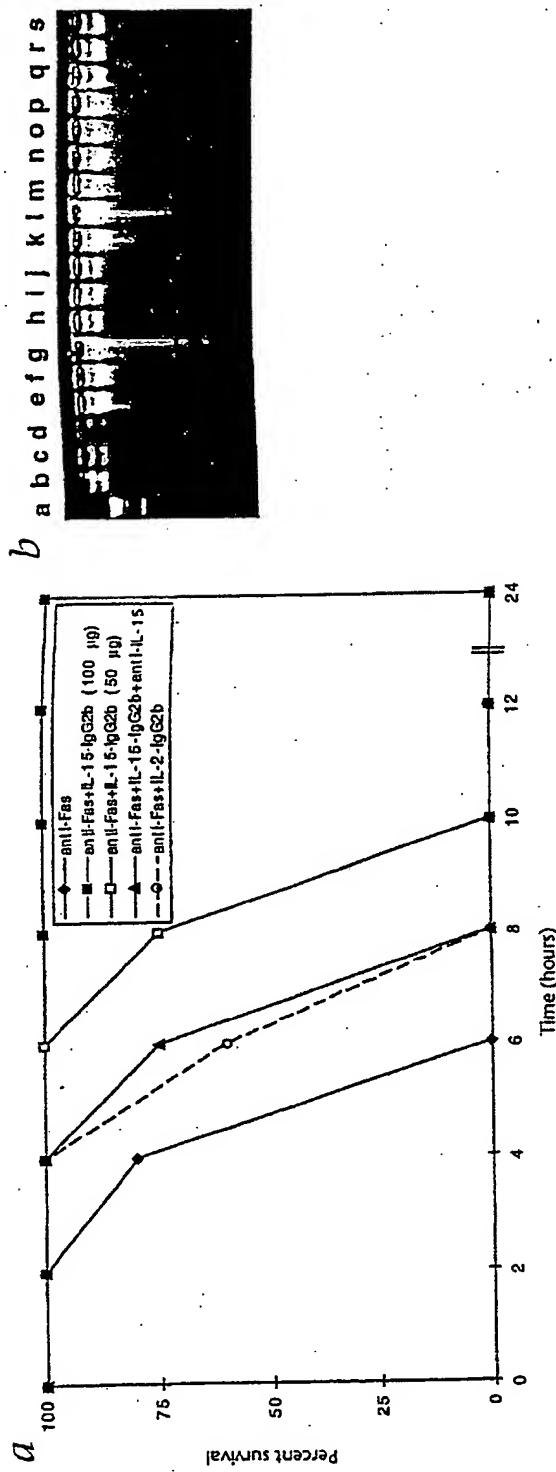


Fig. 2 a,b

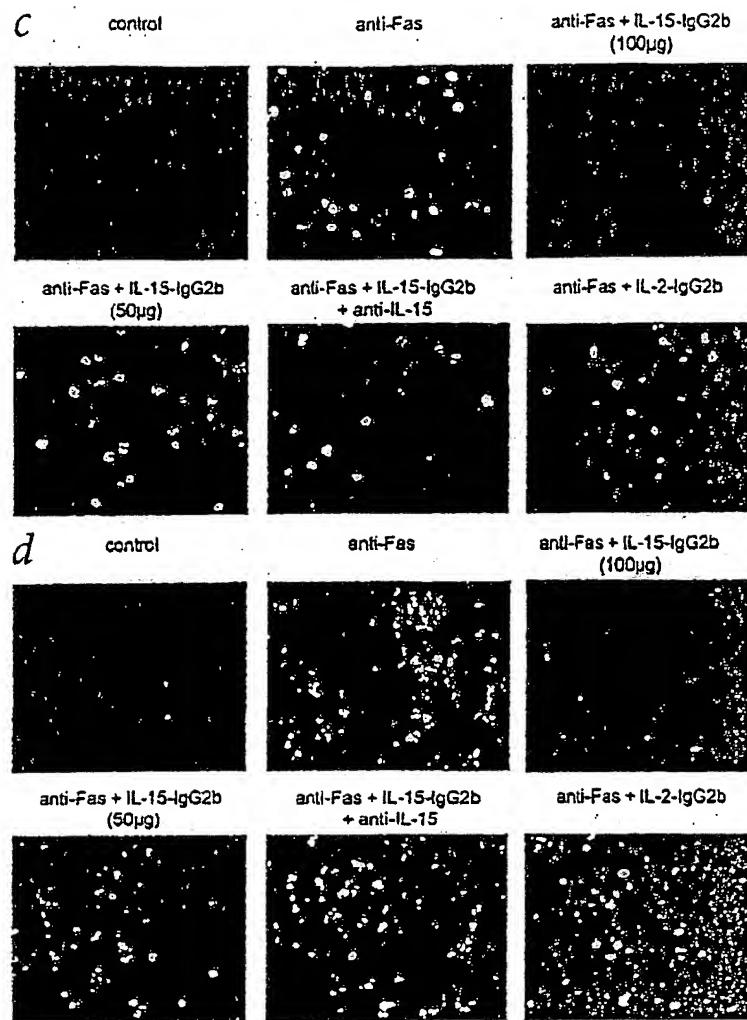


Fig. 2 c, d

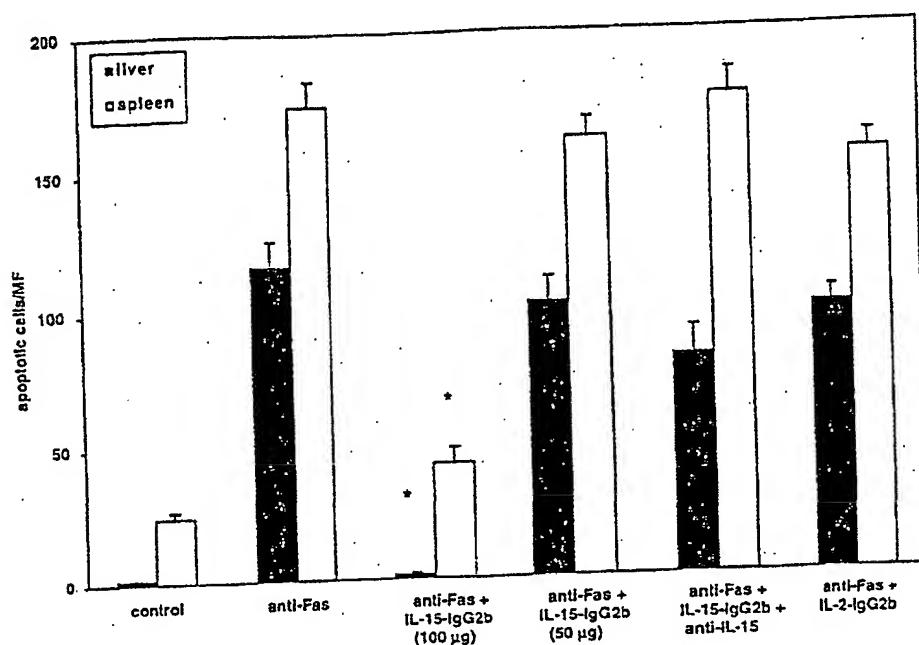


Fig. 3

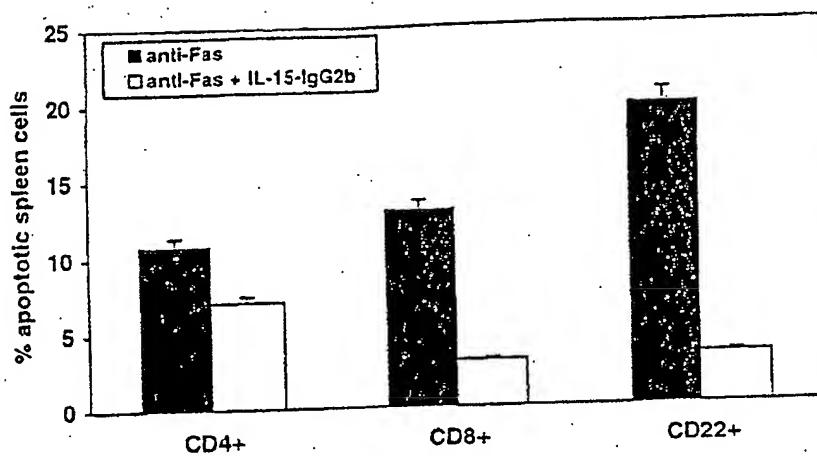


Fig. 4